

## 明 細 書

### クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の簡易検出法

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、 $\beta$ -ラクタマーゼの中でも、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼに特異性の高い阻害剤を用いたクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の簡易検出法に関する。

#### 背景技術

- [0002]  $\beta$ -ラクタマーゼ産生は、腸内細菌をはじめとするグラム陰性菌の  $\beta$ -ラクタム剤に対する主要な耐性機序である。即ち、 $\beta$ -ラクタマーゼは  $\beta$ ラクタム系抗菌薬の  $\beta$ ラクタム環を加水分解し抗菌力を失わせる細菌産生酵素の一つである。
- [0003] [  $\beta$ -ラクタマーゼの種類とその産生菌検出法についてのこれまでの研究 ]
- $\beta$ -ラクタマーゼには、その構造上の特徴からクラス A、B、C、Dの4つのグループがある。本発明者らは、これまでに臨床上大きな問題となっているクラス A の基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ(ESBL)の検出法としてTwin testを、クラス Bのメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの検出法としてSMA法(特開2000-224998号公報)を開発し、広く普及されるに至っている。
- [0004] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼは、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、エンテロバクター属(*Enterobacter* spp.)、シトロバクター・フロインディ(*Citrobacter freundii*)、大腸菌(*Escherichia coli*)など院内感染の原因菌となることの多い菌種の染色体上にあるものや、未だ報告例は少ないが我が国でも見出されているプラスミド上に存在するものがある。クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼは、ペニシリン系やセファロスポリン系の薬剤に対する耐性を付与するため臨床上問題となっていて、その産生菌の簡易な検出法の開発が待たれる。
- [0005] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼの検出法としては、セフォキシチンによるクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の誘導性をみる方法や、粗酵素液を用いた3次元法などの報告はある。しかし、いずれも、判定法や方法の簡便さや平明さにおいて難があり普及するに至っていない。
- [0006] そこで本発明の目的は、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼの簡易な検出法を提供すること

にある。より具体的には、本発明は、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を判別する方法であって、病院の検査室においても実施することが可能な程簡便な方法を提供することにある。

- [0007] さらに本発明は、上記方法を利用して、より簡便にクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を判別する方法を実施できるキット及びこのキットを用いたクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を判別する方法を提供することにある。

#### 発明の開示

- [0008] 上記課題を解決するための本発明は以下の通りである。

[1] 検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び $\beta$ -ラクタム薬を、距離を置いて点在させ、上記固体培地を培養し、培養後、上記 $\beta$ -ラクタム薬の周囲に形成される阻止円が、上記クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤側に拡張したか否かにより、検出対象である菌がクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法。

[2] クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤と $\beta$ -ラクタム薬との間の距離が、培養期間中にクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤が拡散する範囲と $\beta$ -ラクタム薬が拡散する範囲とが重複するように設定する、[1]に記載の方法。

[3] クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有するディスク及び $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクを用いて、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び $\beta$ -ラクタム薬をそれぞれ点在させる[1]または[2]に記載の方法。

[4] 検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び $\beta$ -ラクタム薬の混合物、並びに $\beta$ -ラクタム薬を、距離を置いて点在させ、上記固体培地を培養し、培養後、上記混合物の周囲に形成される阻止円と、上記 $\beta$ -ラクタム薬の周囲に形成される阻止円の違いにより、検出対象である菌がクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法。

[5] クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスク及び $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクを用いて、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び $\beta$ -ラクタム薬の混合物、並びに $\beta$ -ラクタム薬をそれぞれ点在させる[4]に記載の方法。

[6] クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤がボロン酸化合物である[1]～[5]のいずれかに

記載の方法。

[7] ボロン酸化合物が3-アミノフェニルボロン酸である[6]に記載の方法。

[8]  $\beta$ -ラクタム薬が第3世代セフェム薬である[1]〜[7]のいずれかに記載の方法。

[9] 第3世代セフェム薬がセフトジジムまたはセフトキシムである[8]に記載の方法。

[10] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有するディスク及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクを、1つずつストリップ状の基体に配置したことを特徴とするクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌判別用キット。

[11] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスク及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクを、1つずつストリップ状の基体に配置したことを特徴とするクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌判別用キット。

[12] [10]または[11]に記載のキットを検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に置き、培養を行い、培養後、2つのディスクの周囲に形成される阻止円の違いにより、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法。

[13]  $\beta$ -ラクタム薬を段階的に希釈して含有し、かつ等濃度のクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有する複数の液体培地を用意し、各液体培地に、検出対象である菌を接種し、培養を行い、培養後、MICの低下から、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法。

[14] MICの低下が8倍以上である場合、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であると判定する、[13]に記載の方法。

[15] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤がボロン酸化合物である[13]または[14]に記載の方法。

[16] ボロン酸化合物が3-アミノフェニルボロン酸である[15]に記載の方法。

[17]  $\beta$ -ラクタム薬が第3世代セフェム薬である[13]〜[16]のいずれかに記載の方法。

[18] 第3世代セフェム薬がセフトジジムまたはセフトキシムである[17]に記載の方法。

[0009] 本発明によれば、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を、病院の検査室においても実施することが可能な程簡便な方法で判別することができる。

さらに本発明によれば、より簡便にクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を判別する方法を実施できるキット及びこのキットを用いたクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を判別する方法を提供することがある。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0010] 後述するが、ボロン酸化合物やモノバクタム誘導体Syn2190などは、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼを阻害する物質として報告されている。しかし、これらの阻害剤を用いてクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を判別する方法は、知られていない。

[0011] [本発明の方法の第1の態様]

本発明の方法の第1の態様は、検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬を、距離を置いて点在させ、上記固体培地を培養し、培養後、上記  $\beta$ -ラクタム薬の周囲に形成される阻止円が、上記クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤側に拡張したか否かにより、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法である。

[0012] 本発明に用いられる固体培地は、通常の薬剤感受性試験等に汎用されている固体培地でよい。固体培地は、例えば、炭素源、窒素源等の栄養分を含む寒天培地であることができる。そのような固体培地としては、例えばミュラーヒントン寒天培地(Difco社)等を挙げることができる。

[0013] 上記固体培地の表面に検出対象である菌を塗布する。固体培地表面への菌の塗布方法や条件等は、薬剤感受性試験等で採用されているものをそのまま使用できる。例えば、日本化学療法学会標準法またはNCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)で定められたディスク拡散法で指定されている方法を用い、ミュラーヒントン寒天培地に菌を塗布することができる。

[0014] 次いで、検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬を、距離を置いて点在させる。各薬剤の点在には、具体的には、 $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクとクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有するディスクを用いることが適当である。 $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクは、市販

品があり、これを用いることができる。また、 $\beta$ -ラクタム薬は、治療薬として市販されているものから適宜選択することが出来、例えば、第3世代セフェム薬、セファマイシン薬等であることができる。また、第3世代セフェム薬、セファマイシン薬としては、例えば、セフトジジム、ラタモキシセフ、セフメノキシム、セフォタキシム等を挙げることができる。但し、これらの薬剤に限定される意図ではない。尚、ディスクとして市販品がない場合でも、適当な寸法及び形状の濾紙に $\beta$ -ラクタム薬を、必要により、溶媒を用いて含浸させることで作成することができる。

- [0015] クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有するディスクは、適当な寸法及び形状の濾紙にクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含浸させることで作成することができる。クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤は、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼに対して阻害効果を有する薬剤から適宜選択することができる。クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼに対して阻害効果を有する薬剤としては、例えば、ボロン酸化合物、ホウ酸、モノバクタム誘導体、フェニルアセチルグリシル異項環誘導体等を挙げることができる。

さらに、ボロン酸化合物としては、例えば、3-アミノフェニルボロン酸、3-ニトロフェニルボロン酸、2-チオフェンボロン酸、ベンゾ[b]チオフェン-2-ボロン酸等を挙げることができる。

- [0016]  $\beta$ -ラクタム薬及びクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の点在量は、各薬剤の固体培地表面での拡散性や培養時間(拡散時間)、さらにはクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼに対する阻害効果の強度等を考慮して適宜決定できる。例えば、 $\beta$ -ラクタム薬の場合、セフトジジムでは点在量を $30\mu\text{g}$ とすることが適当であり、またクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の場合、3-アミノフェニルボロン酸では、 $300\sim 500\mu\text{g}$ の範囲とすることが適当である。

但し、これらはあくまでも目安であり、検査対象とする菌の種類に応じて、 $\beta$ -ラクタム薬の周囲に形成される阻止円の形状や大きさ等を考慮して適宜変化させることができる。

- [0017] クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤と $\beta$ -ラクタム薬との間の距離は、両者の相互作用を利用してクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を検出するという観点から、培養期間中にクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤が拡散する範囲と $\beta$ -ラクタム薬が拡散する範

囲とが重複するように設定することが適当である。

[0018]  $\beta$ -ラクタム薬及びクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の拡散範囲は、各薬剤の種類と点在量、及び培養条件(主に時間)により変化するので、両者が拡散する範囲が重複するようにクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤と  $\beta$ -ラクタム薬との距離は、ディスクの中心間距離にして、例えば、1〜2cm程度であることが適当である。

[0019] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬を表面に置いた固体培地は、培養される。培養条件は、例えば、35〜37℃、12〜36時間の範囲とすることができる。但し、培養条件、特に時間は、上記薬剤の拡散範囲との兼ね合いを考慮して適宜決定する。

[0020] 上記培養により、固体培地表面に置かれた  $\beta$ -ラクタム薬及びクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤は、固体培地表面及び内部を拡散する。対象とする菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌である場合、この菌は、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼを産生することにより  $\beta$ -ラクタム薬に対する感受性が低下する。従って、固体培地表面に  $\beta$ -ラクタム薬だけを置いたのでは、阻止円は観察されないか、観察されても、ディスクに近接した小さな阻止円が形成されるだけである。

[0021] ところが、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を  $\beta$ -ラクタム薬にある程度の距離で配置すると、 $\beta$ -ラクタム薬とクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤との拡散範囲が重複する位置にある  $\beta$ -ラクタム薬の周囲には、対象とする菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であっても阻止帯が観察される。

これは、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤により、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼの活性が阻害され、その結果、 $\beta$ -ラクタム薬が菌の生育を妨げることができるようになったためである。ここで観察される阻止帯の形状は、 $\beta$ -ラクタム薬の拡散範囲とクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の拡散範囲との重複の程度により変化するが、一般的には、歪んだ形になる。即ち、 $\beta$ -ラクタム薬の周囲に形成される阻止円は、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤側に拡張する。この形状が変化した阻止円は、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の拡散範囲と重複しない位置にある  $\beta$ -ラクタム薬の周囲に形成される阻止円とは、大きさの違いから明確に区別できる。

[0022] 一方、検査対象がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌でない場合には、2つの場合が

ある。 $\beta$ -ラクタム薬が菌の生育を妨げ、大きめの阻止円を形成する感受性菌である場合とクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌ではないが、 $\beta$ -ラクタム薬によっては菌の生育が妨げられず阻止円が形成されない場合(例えば、クラスAまたはB $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌等の菌の場合)である。前者は、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌でないので、 $\beta$ -ラクタム薬のみの薬剤感受性試験で判別できる。即ち、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を併用しない場合でも $\beta$ -ラクタム薬の周囲にゆがみのない大きな阻止円が形成され、判別できる。後者は、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を併用せずに $\beta$ -ラクタム薬のみを使用した薬剤感受性試験ではクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であるのか否かは判別できない。それに対して本発明の方法では、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を近接して配置した場合でも、 $\beta$ -ラクタム薬の周囲には阻止円が形成されないか、あるいは形成されたとしてもクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤により変形、ゆがみを形成しない。従って、本発明の方法では、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼとクラスAまたはB $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌とを判別することが可能である。

[0023] [本発明の方法の第2の態様]

本発明の方法の第2の態様は、検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び $\beta$ -ラクタム薬の混合物、並びに $\beta$ -ラクタム薬を、距離を置いて点在させ、上記固体培地を培養し、培養後、上記混合物の周囲に形成される阻止円と、上記 $\beta$ -ラクタム薬の周囲に形成される阻止円の違いにより、検出対象である菌がクラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法である。

[0024] 本発明の第2の態様で用いる固体培地、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び $\beta$ -ラクタム薬は、本発明の方法の第1の態様で用いるものと同様である。また、固体培地の培養条件も、本発明の方法の第1の態様で用いるものと同様である。

[0025] 本発明の方法の第2の態様では、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び $\beta$ -ラクタム薬の混合物、並びに $\beta$ -ラクタム薬をそれぞれ点在させる際、クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤と $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスク及び $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクを用いることが好ましい。 $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクは、本発明の方法の第1の態様で用いるものと同様である。クラスC型 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び $\beta$ -ラクタム

薬を含有するディスクは、例えば、 $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクに、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤をさらに含浸させることで作成することができる。

- [0026] 本発明の方法の第2の態様では、本発明の方法の第1の態様と異なり、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬の混合物と  $\beta$ -ラクタム薬との間の距離は、培養期間中に前記混合物中のクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤が拡散する範囲と  $\beta$ -ラクタム薬(混合物ではない)が拡散する範囲とが重複するように設定する必要はない。むしろ、各点在点(好ましくは各ディスク)からの薬剤の拡散する範囲は重複しない様に設定する。例えば、ディスクの中心距離にして3cm以上離して点在させる。
- [0027]  $\beta$ -ラクタム薬だけの場合、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌が産生するクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼの作用により、菌の生育はほとんど、または全く妨げられない。従って、阻止円は観察されないか、または観察されても小さい。
- [0028] それに対して、 $\beta$ -ラクタム薬とクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤との混合物の場合では、対象とする菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であっても大きな阻止円が観察される。これは、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤により、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼの活性が阻害され、その結果、 $\beta$ -ラクタム薬が菌の生育を妨げることができるようになったためである。従って、 $\beta$ -ラクタム薬のみの周囲に形成される阻止円(形成されない場合もあるが)とは大きさの違いから明確に区別できる。すなわち、阻止円径5mm以上の拡大が認められれば、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌と判定できる。
- [0029] 一方、検査対象がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌でない場合には、2つの場合がある。 $\beta$ -ラクタム薬が菌の生育を妨げ、大きめの阻止円を形成する感受性菌である場合とクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌ではないが、 $\beta$ -ラクタム薬によっては菌の生育が妨げられず阻止円が形成されない場合(例えば、クラスAまたはB  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌等の菌の場合)である。前者は、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌でないので、 $\beta$ -ラクタム薬のみの薬剤感受性試験で判別できる。即ち、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含む、含まないにかかわらず2つのディスクの周囲に同程度の大きな阻止円が形成され、判別できる。後者は、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を併用せずに  $\beta$ -ラクタム薬のみを使用した薬剤感受性試験ではクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であるのか否かは判別できない。それに対して本発明の方法では、クラスC型



$\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含む場合も含まない場合も阻止円は形成されないか、形成されても小さく、両者の阻止円の大きさはほとんど変化しない。従って、本発明の方法では、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼとクラスAまたはB  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌とを判別することが可能である。

[0030] [本発明のキット]

本発明のクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌判別用キットは、

(1)クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有するディスク及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクを、1つずつストリップ状の基体に配置したことを特徴とするものと、(2)クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスク及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクを、1つずつストリップ状の基体に配置したことを特徴とするものが有る。

(1)のクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌判別用キットは、上記本発明の方法の第1の態様に用いられ、(2)のクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌判別用キットは、上記本発明の方法の第2の態様に用いられる。

[0031] 本発明のキットに使用する  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクは上記本発明の方法で説明したものと同様のディスクを使用できる。また、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させるためのディスクは、濾紙等のクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させることができるものであれば良い。また、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクは、 $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクにクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含浸させたものであることができる。これらのディスクをストリップ状の基体に一列に配置する。

[0032] ストリップ状の基体の形状や寸法には特に制限はない。このキットを使用する固体培地の大きさ等を考慮して適宜決定できる。尚、ストリップ状の基体は、阻止円の判読を容易にするため、透明性の高い素材で形成することもできる。各ディスクの間隔や  $\beta$ -ラクタム薬のディスク中の含有量等は、上記本発明の方法において説明したと同様の点を考慮して適宜決定できる。

[0033] 上記本発明のキットを用いるクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の判別方法は、上記のキットを検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に置き、培養を行い、培

養後、2つのディスクの周囲に形成される阻止円の違いにより、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する。この方法は、上記キットを用いること以外は、上記本発明の方法をそのまま用いることができる。

[0034] [本発明の方法の第3の態様]

本発明の方法の第3の態様は、微量液体希釈法に基づく方法である。この方法では、まず、 $\beta$ -ラクタム薬を段階的に希釈して含有し、かつ等濃度のクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有する複数の液体培地を用意する。

液体培地としては、例えば、ミューラー・ヒントン液体培地(Ditco社)等を用いることができる。

$\beta$ -ラクタム薬及びクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤は、本発明の方法の第1の態様で説明したものと同様である。

液体培地中での  $\beta$ -ラクタム薬の段階的な希釈の程度は、例えば、0.5〜256  $\mu$ g/mlの範囲とすることができる。

また、各液体培地中のクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の濃度は等しくし、例えば、3-アミノフェニルボロン酸であれば、例えば、200  $\mu$ g/mlとすることができる。

[0035] このように準備された各液体培地に、検出対象である菌を接種し、培養を行う。培養条件は、固体培地を用いる場合と同様にすることができる。

[0036] 培養後、MICの低下から、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別することができる。具体的には、MICの低下が8倍以上である場合、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であると判定することができる。

### 実施例

[0037] 以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

実施例1(本発明の方法の第1の態様)

被検菌をNCCLSの推奨するディスク拡散法に基づく方法でミューラー・ヒントン寒天培地に接種した。被検菌としては以下の表1に示すものを用いた。

[0038] [表1]

被検菌名
E.cloacae HKY226
C.freundi HKY543
S.marcescens S94
P.aeruginosa 03-192
K.pneumoniae MOX-1
E.coli CMY-2
K.pneumoniae DHA-1[+CTX-M9]
K.pneumoniae SHV-12 クラス A
K.pneumoniae IMP-1 クラス B

- [0039] その上にAPBを300  $\mu$ gしみ込ませたディスク(栄研化学製、直径6mm)を置き、その左右にセフトジジム(CAZ)とセフトキシム(CTX)のKBディスク(直径6mm)を中心距離にして約18mm離して配置した。図1及び2に写ったシャーレの上段の3つのディスクが左から、CAZ、APB、CTXのディスクである。
- 発育阻止帯の状況及び形状を下記表2に記載する。

- [0040] [表2]

被検菌名	
E.cloacae HKY226	ディスク間距離を 10mm に配置すると CAZ、CTX の周囲には APB のディスクに引っ張られるように阻止円が認められる。陽性
C.freundi HKY543	APB のディスク周囲には阻止円を認めないが、CAZ、CTX のディスク周囲には阻止円がみられ、いずれも APB のディスクに引っ張られるように変形している 陽性
S.marcescens S94	CAZ、CTX 両方のディスクの周囲に阻止円が認められ、いずれも APB のディスクに引っ張られるように変形が認められる。陽性
P.aeruginosa 03-192	CAZ のディスク周囲にのみ阻止円が認められ、APB ディスクの方に変形拡大している。陽性
K.pneumoniae MOX-1	P.aeruginosa 03-192 に同じ(陽性)
E.coli CMY-2	S.marcescens S94 に同じ(陽性)
K.pneumoniae DHA-1[+CTX-M9]	CAZ、CTX ディスク共に周囲に阻止円が認められ、CAZ のみに APB ディスクに向かって引っ張られるように変形がみられる。陽性
K.pneumoniae SHV-12 クラス A	CTX ディスク周囲に阻止円が認められるが APB ディスクに向かって変形はみられない。陰性
K.pneumoniae IMP-1 クラス B	SHV-12 に同じ(陰性)

[0041] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌では、図1及び2に示すように、一晚培養後CAZまたはCTXの周囲の発育阻止帯がAPBのディスクに引っ張られるようにゆがんで観察された。即ち、 $\beta$ -ラクタム薬(CAZまたはCTX)の周囲に形成される阻止円が、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤(APB)側に拡張しており、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であることが判定できる。それに対して、クラスC以外のクラス A やクラス B  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌では発育阻止円のゆがみは認められなかった。

[0042] 実施例2(本発明の方法の第2の態様)

被検菌を上記実施例1と同様にミューラー・ヒントンス寒天培地に接種し、CAZのKBディスク(直径6mm)を中心距離にして3cm以上離して配置した。一方のCAZディスクにAPBを300  $\mu$ gしみ込ませ、一晚培養後2つのCAZディスクの周囲の発育阻止円の径

を測定した。図1及び2に写ったシャーレの下段の2つのディスクが左から、CAZ、CAZ+APBのディスクである。結果を下記表3にコメントともに示す。

[0043] [表3]

被検菌名	
E.cloacae HKY226	CAZ ディスク周囲には阻止円はみられない。CAZ+APB ディスク周囲には阻止円が認められ阻止円径の拡大は5mm 以上である。陽性
C.freundi HKY543	CAZ ディスク周囲には小さな阻止円が認められる。CAZ+APB ディスク周囲には阻止円が径にして 5mm 以上の拡大がみられる。陽性
S.marcescens S94	C.freundii HKY543 に同じ
P.aeruginosa 03-192	C.freundii HKY543 に同じ
K.pneumoniae MOX-1	C.freundii HKY543 に同じ
E.coli CMY-2	C.freundii HKY543 に同じ
K.pneumoniae DHA-1[+CTX-M9]	C.freundii HKY543 に同じ
K.pneumoniae SHV-12 クラス A	CAZ 及び CAZ+APB ディスク周囲には阻止円は認めない。陰性
K.pneumoniae IMP-1 クラス B	SHV-12 に同じ

[0044] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌では、図1及び2に示すように、5mm以上の径の拡大(APBを含まないディスクに対して)が見られ、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌と判定できる。それに対して、クラスC以外のクラス Aやクラス B  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌では発育阻止円の拡大は認められなかった。

[0045] 実施例3(本発明の方法の第3の態様)

CAZを段階希釈したミューラー・ヒント液体培地と、CAZの段階希釈に200  $\mu$ gのAPBを加えたミューラー・ヒント液体培地を作製し、被検菌をNCCLSの推奨する微量液体希釈法に基づいた方法で接種した。一晚培養後MICを測定した。結果を以下の表4に示す。

[0046] [表4]

菌株 (産生 $\beta$ -ラクタマーゼ)	MIC ( $\mu$ g/ml)			
	CAZ	CAZ+CA	CAZ+SMA	CAZ+APB
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
HKY402 (SHV-12: クラス A)	>512	$\leq 0.5$	512	>512
KP115 (IMP-1: クラス B)	256	256	$\leq 0.5$	512
NU2936 (MOX-1: クラス C)	64	64	32	1
<i>E. cloacae</i> HKY226	256	—	—	32
<i>C. freundii</i> HKY543	64	—	—	1
<i>S. marcescens</i> S94	64	—	—	2
<i>P. aeruginosa</i> NCB03-192	16	—	—	2
<i>K. pneumoniae</i> NCB02189DHA-1+CTX-M9	64	—	—	8
<i>E. coli</i> NS12CMY-2	64	—	—	4

CAZ:セフトジジム、CA:クラブラン酸、SMA:メルカプト酢酸ナトリウム、

APB:3-アミノフェニルボロン酸

CAは4  $\mu$ g/ml、SMAは500  $\mu$ g/ml、APBは200  $\mu$ g/ml、の濃度で使用した。

[0047] CAZのみのMICに比べて、CAZ+APBのMICが8倍以上低下した場合、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌と判定した。実施例1及び2でクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌と判定された菌は、いずれも8倍以上のMICの低下が認められた。それに対して、クラスC以外のクラスAやクラスB  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌ではMICの低下は認められなかった。

尚、CAZ+CA及びCAZ+SMAの場合、前者はクラスA型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌においてのみCAZの場合に比べて8倍以上のMICの低下がみられ、後者の場合はクラスB型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌においてのみCAZの場合に比べて8倍以上のMICの低下を認める。

#### 産業上の利用可能性

[0048] 本発明は、病院の検査室においても実施することが可能な程簡便なクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼの簡易な検出法を提供することができる。

#### 図面の簡単な説明

[0049] [図1]実施例1及び2の結果を示す。

[図2]実施例1及び2の結果を示す。

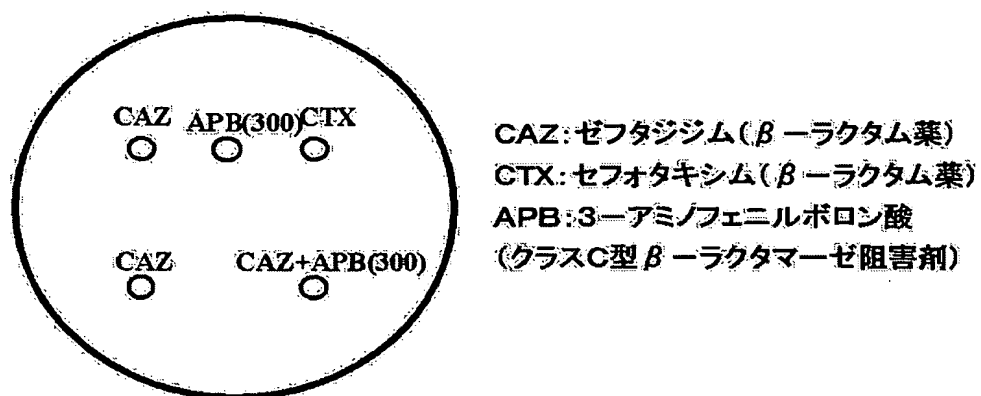
## 請求の範囲

- [1] 検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬を、距離を置いて点在させ、上記固体培地を培養し、培養後、上記  $\beta$ -ラクタム薬の周囲に形成される阻止円が、上記クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤側に拡張したか否かにより、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法。
- [2] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤と  $\beta$ -ラクタム薬との間の距離が、培養期間中にクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤が拡散する範囲と  $\beta$ -ラクタム薬が拡散する範囲とが重複するように設定する、請求項1に記載の方法。
- [3] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有するディスク及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクを用いて、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬をそれぞれ点在させる請求項1または2に記載の方法。
- [4] 検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬の混合物、並びに  $\beta$ -ラクタム薬を、距離を置いて点在させ、上記固体培地を培養し、培養後、上記混合物の周囲に形成される阻止円と、上記  $\beta$ -ラクタム薬の周囲に形成される阻止円の違いにより、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法。
- [5] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスク及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクを用いて、クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬の混合物、並びに  $\beta$ -ラクタム薬をそれぞれ点在させる請求項4に記載の方法。
- [6] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤がボロン酸化合物である請求項1〜5のいずれか1項に記載の方法。
- [7] ボロン酸化合物が3-アミノフェニルボロン酸である請求項6に記載の方法。
- [8]  $\beta$ -ラクタム薬が第3世代セフェム薬である請求項1〜7のいずれか1項に記載の方法。
- [9] 第3世代セフェム薬がセフトジジムまたはセフトキシムである請求項8に記載の方法。
- [10] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有するディスク及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するデ

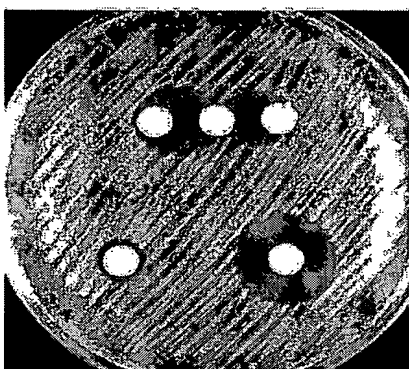


- ディスクを、1つずつストリップ状の基体に配置したことを特徴とするクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌判別用キット。
- [11] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスク及び  $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクを、1つずつストリップ状の基体に配置したことを特徴とするクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌判別用キット。
- [12] 請求項10または11に記載のキットを検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に置き、培養を行い、培養後、2つのディスクの周囲に形成される阻止円の違いにより、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法。
- [13]  $\beta$ -ラクタム薬を段階的に希釈して含有し、かつ等濃度のクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有する複数の液体培地を用意し、各液体培地に、検出対象である菌を接種し、培養を行い、培養後、MICの低下から、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法。
- [14] MICの低下が8倍以上である場合、検出対象である菌がクラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であると判定する、請求項13に記載の方法。
- [15] クラスC型  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤がボロン酸化合物である請求項13または14に記載の方法。
- [16] ボロン酸化合物が3-アミノフェニルボロン酸である請求項15に記載の方法。
- [17]  $\beta$ -ラクタム薬が第3世代セフェム薬である請求項13〜16のいずれか1項に記載の方法。
- [18] 第3世代セフェム薬がセフトジジムまたはセフトキシムである請求項17に記載の方法。

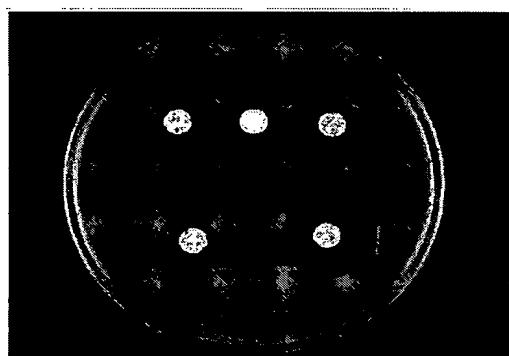
[図1]



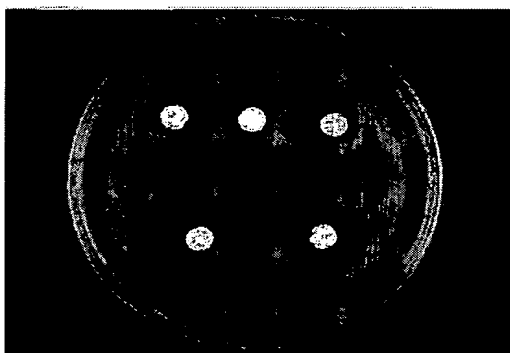
陽 性

*E. cloacae* HKY226

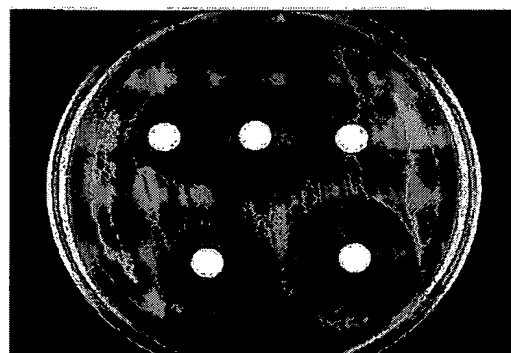
陽 性

*C. freundii* HKY543

陽 性

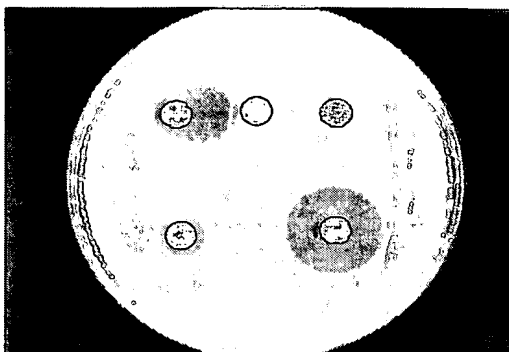
*S. marcescens* S94

陽 性

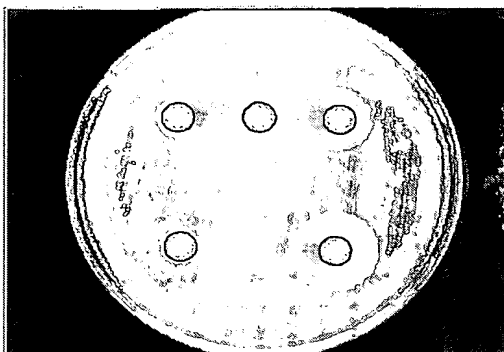
*P. aeruginosa* 03-192

[図2]

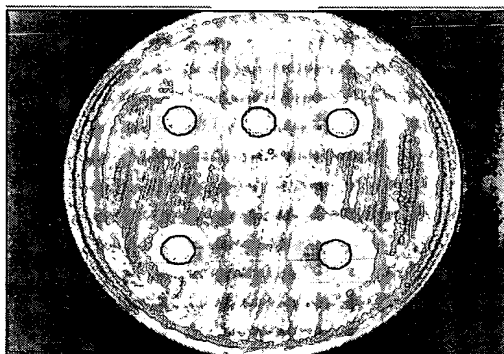
陽 性

*K. pneumoniae* MOX-1

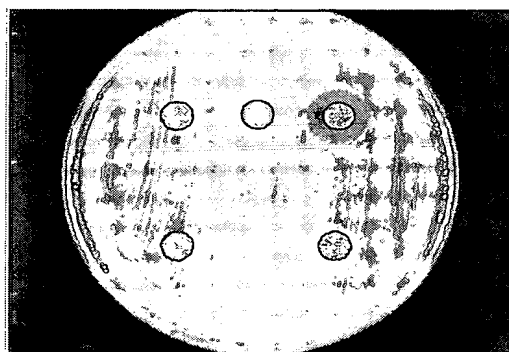
陽 性

*E. coli* CMY-2

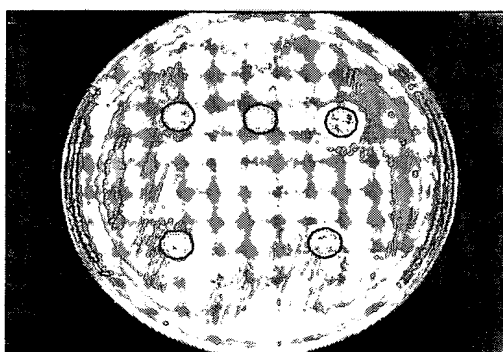
陽 性

*K. pneumoniae* DHA-1 [+CTX-M9]

陰 性

*K. pneumoniae* SHV-12 クラス A

陰 性

*K. pneumoniae* IMP-1 クラス B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018630

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPLUS FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-224998 A (Director General of National Institute of Infections Diseases), 15 August, 2000 (15.08.00), (Family: none)	1-3, 6-12
Y	JP 2000-316597 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 21 November, 2000 (21.11.00), (Family: none)	4-18
Y	JP 2003-135093 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 13 May, 2003 (13.05.03), (Family: none)	13-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 January, 2005 (19.01.05)

Date of mailing of the international search report  
08 February, 2005 (08.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018630

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Nagy Elisabeth et al., Investigation of the presence of different broad-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (1998), Vol.45, No.3-4, pages 433 to 446	1-18
Y	JP 2002-504122 A (Northwestern University), 05 February, 2002 (05.02.02), & WO 98/56392 A1 & EP 1009415 A1 & US 6184363 B1 & US 6417174 B1 & US 6448238 B1	6,7,15,16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12Q1/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPLUSファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2000-224998 A (国立感染症研究所長) 2000.08.15 (ファミリーなし)	1-3, 6-12
Y	JP 2000-316597 A (栄研化学株式会社) 2000.11.21 (ファミリーなし)	4-18
Y	JP 2003-135093 A (栄研化学株式会社) 2003.05.13 (ファミリーなし)	13-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
19.01.2005

国際調査報告の発送日  
08.02.2005

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
佐久 敬

4B 3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Nagy Elisabeth, et al., Investigation of the presence of different broad-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (1998), Vol. 45, No. 3-4, p. 433-446	1-18
Y	JP 2002-504122 A (ノースウエスタン ユニバーシティー)2002.02.05 & WO 98/56392 A1 & EP 1009415 A1 & US 6184363 B1 & US 6417174 B1 & US 6448238 B1	6, 7, 15, 16

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☒ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**